

(19)

KOREAN PATENT ABSTRACTS

(11) Publication number: 1020020044851 A

(43) Date of publication of application: 19.06.2002

(21) Application number: 1020000074074

(71) Applicant:

DOOSAN CORPORATION
PHARMA FOODS
INTERNATIONAL CO., LTD.

(22) Date of filing: 07.12.2000

(72) Inventor:

KIM, JIN UK
KO, UI CHAN
PARK, JANG SEO

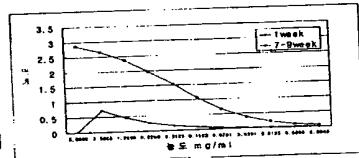
(51) Int. Cl

A61K 39/40

(54) SPHINGOLIPID COMPOSITION FOR PREVENTION AND TREATMENT OF ACNE

(57) Abstract:

PURPOSE: A preventing and therapeutic composition simultaneously containing a specific antibody on *Propionibacterium acnes* as causative bacteria and a sphingolipid composition effective for suppressing skin inflammation and regenerating a damaged skin membrane as a major component of a skin protection membrane is provided. Therefore, the composition is effective for treatment and prevention of acne by rapid recovery of a damaged skin.



CONSTITUTION: The pharmaceutical composition for the prevention and treatment of acne contains 1.0 part by weight of a hen's egg antibody capable of specifically binding to *Propionibacterium acnes* and 0.1 to 10.0 parts by weight of sphingolipid. The composition is a skin lotion, cream, soap, body cleanser and ointment containing 0.01 to 30% by weight of the composition as an effective ingredient.

&copy; KIPO 2003

Legal Status

Date of request for an examination (20001207)

Notification date of refusal decision (20030722)

Final disposal of an application (rejection)

Date of final disposal of an application (20030722)

BEST AVAILABLE COPY

(19) 대한민국특허청(KR)
 (12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl. 7
 A61K 39/40

(11) 공개번호 특2002-0044851
 (43) 공개일자 2002년06월19일

(21) 출원번호 10-2000-0074074
 (22) 출원일자 2000년12월07일

(71) 출원인 주식회사 두산
 죄승철
 서울특별시 중구 을지로6가 18-12
 가부시키 가이샤 파마 푸즈 연구소
 김무조
 일본 601-8357 교토 미나미구 기스쇼인-이시하라 도노아또-니시마찌 24-5

(72) 발명자 김진욱
 경기도 용인시 수지읍 풍덕천리 699 한국아파트 102-306
 박장서
 경기도 파천시 별양동 주공아파트 710-401
 고의찬
 서울특별시 강남구 논현동 105동 현아아파트 1동 201호

(74) 대리인 김동완

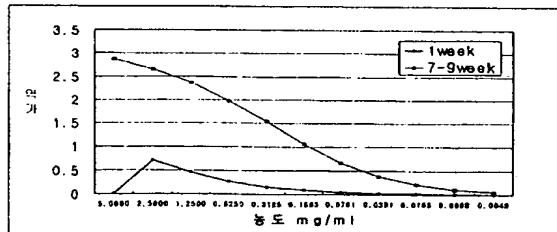
심사청구 : 있음

(54) 여드름 예방 및 치료용 스팽고리피드 조성물

요약

본 발명은 여드름균인 프로피오니박테리움 아크네스에 대한 계란항체 1.0 중량부에 대해 피부 보호막의 주요 성분인 스팽고리피드 0.1~10.0 중량부를 혼합한 여드름 예방 및 치료용 의약 조성물에 관한 것으로, 여드름의 원인균인 프로피오니박테리움 아크네스에 대한 특이적인 계란항체와 피부의 염증을 억제하면서 여드름에 의한 피부장벽의 손상을 빠르게 회복시키는 기능을 가진 스팽고리피드를 동시에 함유하는 여드름 치료용 조성물에 관한 것이다.

대표도



색인어

여드름, 스팅고리피드, 파이토스핑고신, 계란항체, 프로피오니박테리움 아크네스, 의약 조성물

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명의 계란항체의 역가를 1주째 난황을 이용한 측정결과와 7~9주째 난황을 이용한 측정결과를 나타낸 그레프이다.

-●- : 1주째 난황을 이용한 측정결과

-■- : 7~9주째 난황을 이용한 측정결과

도 2a는 프로피오니박테리움 아크네스 군의 성장에 대한 세라마이드, 파이토스핑고신 및 에리트로마이신 농도별 항균력을 측정한 그레프이다.

도 2b는 스타필로코커스 아우레우스 군의 성장에 대한 파이토스핑고신, 파이트스핑고신- α 하이드록실산, 염산파이토스핑고신, 탄소수 11의 세라마이드 및 대조군의 농도별 항균력을 측정한 그레프이다.

도 3은 본 발명의 파이토스핑고신을 함유한 여드름 치료용 조성물의 PKC 저해효과를 대조군인 감초추출물과 비교하여 나타낸 그레프이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 여드름의 원인균인 프로피오니박테리움 아크네스에 대한 특이적인 계란항체와 피부의 유해 미생물 및 피부 염증을 억제하면서 여드름에 의한 피부장벽의 손상을 빠르게 회복시켜주는 기능이 뛰어난 스팅고리피드를 포함하는 계란항체 및 스팅고리피드를 함유하는 여드름 치료 및 예방용 의약 조성물에 관한 것이다.

여드름은 사춘기 남녀의 얼굴 특히 볼과 이마에 많은 모 피지선의 만성염증성 질환으로 면포, 구진, 농포, 낭종, 결절 그리고 가끔 반흔형성을 특징으로 하는 피지선 관련 질환(Pilosabaceous disease)의 하나이다. 여드름은 주로 사춘기에 발생하여 20대 중반에 쇠퇴하며 주로 남자에서 더욱 심한 형태로 나타난다. 여드름의 기본 병변인 면포(Comedo)는 모낭상피의 과각화로 인하여 각질과 피지가 정체되어 생성되며 개방면포와 폐쇄면포가 있다. 여드름은 주로 나타나는 발진의 형태에 따라 면포성 여드름(acne comedo), 구진성 여드름(acne papulosa), 경결성 여드름(acne indurata) 등으로 다양하게 분류된다.

여드름의 원인은 현재 정확히 밝혀져 있지는 않으나 그 주요한 원인으로는 과다한 피지의 분비(High sebum excretion rate), 관의 각질화(Ductal Hyper cornification), 모 피지선(Pilosebaceous duct)에서의 비정상적인 미생물의 증식, 염증반응이 주요 4대 원인으로 알려져 있다. 일반적으로는 이들 여러 요인들의 복합작용에 의해서 일어나며 선천적인 소질과 안드로겐(Androgen) 호르몬에 의한 피지의 과다 분비에 여드름 원인균이 감염되어 증식한 결과 염증을 일으키며 심할 경우에는 반흔을 일으키는 복합적인 현상으로 생각되고 있다.

여드름의 현상을 악화시키는 미생물로는 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*)가 대표적인 것으로 알려져 있으나 이외에도 프로피오니박테리움 아비덤(*Propionibacterium avidum*), 스타필로코커스 에피데미스(*Staphylococcus epidermidis*)와 말라세리아 퍼퍼(*Malassezia furfur*)등이 복합적으로 작용하여 증상을 악화시키는 것으로 알려져 있다.

프로피오니박테리움 아크네스는 좌창의 발병기전인 면포형성과 염증야기에 깊이 관여하는 것으로 알려져 있다. 모누두(毛漏斗)의 관공이 각질화되어 폐쇄되면 피지의 배설 장애를 일으키고 프로피오니박테리움의 균수가 증가하면서 이 균이 분비한 리파제의 작용에 의해 피지중의 중성지방이 분해되어 유리지방산이 생성된다. 이 유리지방산등이 고착성 각질증식을 초래하여 면포를 생성시키는 작용을 한다. 프로피오니박테리움 아크네스는 면포내에 증식하면서 호중구주화인자(好中球走化因子)와 각종 효소를 생산하여 이들이 면포로부터 진피에 누출되면 염증이 야기된다.

현재 여드름의 예방 및 치료법으로는 피지 과인분비의 억제, 모낭폐쇄제거, 세균증식억제 등의 방법이 있으나 만족할 만한 방법은 없다. 여드름의 치료약으로는 피지분비 억제제로서 사용되는 여성호르몬이 있으나 이것은 표피의 생장을 억제하며 피지선의 작용을 억제하는 등의 부작용과 생체내의 다른 호르몬 균형에 영향을 많이 미쳐 거의 사용되지 않고 있다.

또한 프로피오니박테리움 아크네스에 대하여 억제효과가 뛰어난 에리트로마이신등이 사용되고 있으나 위장장애, 간 및 신장에 장해를 주는 등의 부작용이 지적되고 있다. 또한 이러한 항생물질은 균에 대한 특이성이 없으므로 상주균 전체에 영향을 미치며 항생제에 내성을 가지는 균의 발생을 유발(*The Lancet*, vol. 350, 972~973, 1997)하여 여드름의 치료를 더욱더 곤란하게 만드는 경우가 많다. 더욱이 피부상재 미생물 모두를 죽이므로 치료목적이 아닌 예방목적으로는 사용이 곤란하다.

따라서 본 발명은 균에 대한 특이성을 가진 다른 피부 상주균에 거의 영향을 미치지 않고 여드름의 원인균을 효과적으로 억제하기 위하여 프로피오니박테리움 아크네스에 대한 계란 항체를 사용한 치료제를 개발하고자 하였다. 그러나 계란항체를 이용하여 프로피오니박테리움 아크네스를 효과적으로 억제하는 경우에도 다른 미생물에 의한 여드름의 악화, 피부염증과 이로 인한 피부손상을 효과적으로 치료하기는 어려움이 있다.

일반적으로 여드름 부위는 정상부위에 비해 피부 보호막인 스트라티움 코니움(*Stratum corneum*)의 세라마이드의 함량이 두드러지게 감소되어 있는 현상이 관찰되고 있다. 여드름부위의 경우는 정상부위의 평균 45%에 비해 약 25~30 % 정도의 세라마이드 함량을 보인다(*Arch Dermatol Res*, 287:214~218 (1995); *Arch Dermatol Res* 287:214~218 (1995)). 더불어 스팽고신 및 파이토스핑고신의 함량이 정상부위에 비해 적어 미생물의 증식에 좋은 조건을 제공한다.

또한 세라마이드 및 스팽고신 유도체가 부족하게 되면 미생물에 좋은 조건을 제공함과 동시에 피부염증의 발생을 촉진하고, 여드름 부위의 손상된 피부가 빠르게 회복되지 않아 결국에는 상처를 남기게 되는 결과를 가져온다.

파이토스핑고신(*Phytosphingosine*)은 스팽고리피드(*Sphingolipid*)의 일종으로 생체의 주요한 세포막 성분중의 하나로서 구조적인 기능과 함께 신호 전이체계의 신호 전달물질로서 다양한 생물학적 기능을 가지는 생리활성 물질이다(*O-kazaki et al.*, 1989 ; *Kim et al.*, 1991).

스핑고리피드는 세포의 성장, 증식, 분화의 조절, 세포사멸(apoptosis) 유발 등 생명현상의 핵심적인 역할을 하는 것으로 밝혀지고 있으며(Hannun, 1994, 1996; Hannun and Obeid, 1995) TNF- α , IL-1, γ -IFN 및 FAS 리간드(ligand) 등이 관여하는 것으로 밝혀졌다. 스팽고리피드는 피부 보호막 자질의 대부분을 차지하며 피부 보습 유지 및 피부보호막의 재생 기능을 수행함과 동시에 미생물로부터의 공격에 대한 피부의 제 1차 방어막의 기능을 수행한다.

이 외에 스팽고리피드는 프로턴키나제 C의 활성억제 및 활성화, EGF 수용체(Receptor)의 활성조절, 세포내의 Ca^{++} 이온의 유동화(Mobilization) 유발, Rb, NF-B 유전자의 발현조절 등에 관여하는 것으로 알려져 항염 및 항암 연구에 많이 사용되고 있다. 근래에 와서는 여드름, 아토피성 피부염을 비롯한 대부분의 피부병이 피부 지질 중에 각종 스팽고리피드의 함량이 낮아진데 기인(Arch. Dermatol. Res. 289 (1997))하는 것으로 밝혀짐에 따라 스팽고리피드는 피부 병 치료제의 주요 원료로서 항생제와 항염증제인 스테로이드 호르몬을 대체할 수 있는 차세대 의약품 원료로 사용될 수 있는 가능성이 매우 큼 것으로 전망된다.

파이토스팡고신과 파이토스팡고신을 기본 골격으로 하는 세라마이드 III 및 VI는 피부 보습 기능과 손상된 피부보호막의 재생에 효능이 우수하여 스킨케어(Skin care) 화장품용으로 전세계적으로 사용되고 있으며 그 사용범위는 모발 제품에까지 확대되고 있다. 파이토스팡고신은 세라마이드와 더불어 화장품 산업의 보습제, 노화방지제등의 기능성 원료로 사용되기 시작하였으며 세라마이드에 비해 피부재생 및 항균, 항염증 효과가 뛰어나 사용이 급속히 증가되고 있다.

또한 제약산업에 있어서도 아토피성 피부염, 여드름, 상처치료제등에 이미 검토가 진행 중에 있어 향후 파이토스팡고신은 기능성 화장품의 핵심소재로서 화장품 산업의 노화방지제품, 보습제품, 손상된 피부의 재생등을 위한 제품 및 아토피 피부염 치료제, 여드름 치료제, 건선 및 피부 가려움증 치료제, 상처치료제 등으로 그 사용이 확대될 전망이다.

한편, 계란항체를 이용한 여드름의 예방 및 치료에 관해서는 일본특허 평1-313439호, 일본특허 평2-121908호, 일본특허 평2-121909호, 일본특허 평2-121910호 등에 개시되어 있으나, 이는 단지 계란항체만을 이용한 경우이며, 본 발명에서와 같이 여드름의 원인균인 프로피오니박테리움 아크네스에 대한 특이적 계란항체와 피부염증의 억제 및 손상된 피부보호막의 회복에 효과가 우수한 파이토스팡고신 등 스팽고리피드를 함께 사용한 여드름 치료제는 아직 개발되어 있지 않다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

따라서 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 프로피오니박테리움 아크네스에 대한 특이적인 계란항체와 세라마이드, 파이토스팡고신 등의 스팽고리피드를 함께 사용하여 프로피오니박테리움 아크네스를 비롯한 피부 유해미생물의 작용을 억제하고 여드름에 의한 피부염증을 억제함은 물론 손상된 피부를 빠르게 회복시켜 상처가 남지 않고 깨끗하게 치료하는 방법 및 여드름 치료용 의약 조성물을 개발한 것이다.

발명의 구성 및 작용

본 발명은 여드름의 원인균인 프로피오니박테리움 아크네스에 대한 특이적인 항체와 피부 보호막의 주요 성분으로 피부염증의 억제 및 손상된 피부막의 재생에 효과적인 스팽고리피드를 동시에 함유한 여드름의 예방 및 치료용 조성물을에 관한 것이다.

따라서 본 발명은 여드름균인 프로피오니박테리움 아크네스에 대한 계란항체 1.0 중량부에 대해 피부 보호막의 주요 성분인 스팽고리피드 0.1~10.0 중량부를 혼합한 여드름 예방 및 치료용 의약 조성물을 제공하는 것이다.

이때, 상기 계란항체는 수용성 단백질 부분을 초미세여과하여 분자량 10만 이상인 감마-리베친을 사용한 것을 특징으로 한다.

또한, 상기 스팽고리피드는 세라마이드 3, 세라마이드 6, 파이토스팡고신, N-아세틸파이토스팡고신, 테트라아세틸파이토스팡고신, C 6-파이토세라마이드, 스팽고신, 스팽가닌 등에서 선택된 1종 이상의 것이다.

한편, 상기 조성물이 프로피오니박테리움 아크네스, 스타필로코커스 아우레우스 등의 피부 유해 미생물의 증식억제 및 상기 미생물의 작용에 의한 염증을 억제하는 효과를 지니며, 여드름에 의해 야기되는 피부손상을 빠르게 회복시키는 것을 특징으로 한다.

또한, 상기 조성물을 유효성분으로 0.01~30 중량%를 함유한 스킨, 로션, 크림, 비누, 바디클린저, 연고제 등의 제형을 제공하는 것으로, 이때 바람직한 함량은 계란항체의 함량이 0.05~1.0 중량%이고 스펑고리피드의 함량이 0.05~1.5 중량%인 경우이다.

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이러한 실시예들로 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

(실시예 1) 계란항체의 분리정제

본 발명의 방법에 의해 생산된 면역계란에서 계란항체를 분리 정제하는 방법은 다음과 같다.

4회의 면역주사를 통해 항체의 역가가 상승하여 최고치에 오른 6주에서 8주간의 계란을 수거하여 환자와 노른자를 분리하고 노른자를 중류수로 잘 세척한 후 동결시킨다. 동결된 계란의 노른자에 동량의 중류수를 혼합한 후 호모게나이저로 8000rpm에서 약 30분간 혼합하여 균질한 노른자 용액을 얻었다. 여기에 2배 분량의 0.15% 람다 카라기난 용액을 서서히 첨가하면서 서서히 교반한다. 상기의 용액을 약 30분간 방치한 후 8,000rpm에서 30분간 원심분리 한 후 상동액을 얻었다. 상기의 상동액을 규조토를 이용하여 여과한 후 분자량 50,000의 멤브레인 필터(membrane filter)로 여과하여 분자량 100,000이상의 수용성 단백질 부분을 얻었다. 이를 동결 건조하여 총 단백질 함량이 약 70%, 이중 계란항체의 성분이 약 25% 이상인 수용성 단백질 분말을 얻었다.

(실시예 2) 계란항체의 역가 측정

계란항체의 역가 측정은 ELISA(Enzyme linked Immunosorbent assay)방법을 사용하였다. 항원으로 사용한 프로피오니박테리움 아크네스균의 건조분말을 OD 0.9~1.0정도로 혼탁하여 24시간 코팅하였다. 여기에 3%의 소혈청 알부민(Bovine serum albumin)를 이용하여 37°C에서 약 2~3시간 동안 블록하고 단계적으로 희석한 계란항체를 넣어 37°C에서 1시간동안 항원-항체 반응을 유도하였다. 여기에 2차 항체인 래빗 안티 치킨 IgG에 알칼린포스파타제가 결합된 컨쥬게이트를 넣고 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 기질인 p-니트로페닐산 나트륨을 넣은 후 암조전에서 30분간 반응시킨 후 2M NaOH용액으로 반응을 정지시킨 후 흡광도를 측정하였다.

도 1은 본 발명의 계란항체의 역가를 1주째 난황을 이용한 측정결과와 7~9주째 난황을 이용한 측정결과를 나타낸 그레프이다. 도 1에 나타난 바와 같이 7~9주째 난황을 이용한 계란 항체의 프로피오니 박테리움 아크네스에 대한 특이적인 항체 반응 역가가 1주째 난황을 이용한 계란 항체의 역가에 비해 약 3~5배 정도 높았다.

(실시예 3) 계란항체와 파이토스핑고신의 항균력을 검사

상기의 방법으로 추출한 계란항체의 프로피오니박테리움 아크네스에 대한 항균력을 검사하기 위해서 사용한 배지는 중류수 1리터에 Brain Heart Infusion 25g, 효모 추출물 5g, Casitone 4g, L-cystein HCl 1g, 포도당 5g, 가용화 전분 1g, 인산칼륨 15g, 황산암모늄 1g, 황산마그네슘 0.2g, 염화칼슘 0.02g를 균등히 녹인 후 가압 살균한 후 사용하였다. 균을 접종하기 전에 항체를 각각 0, 10, 50, 100, 200ppm이 되도록 첨가한 후 균체를 10^5 세포/ml이 되도록 첨가한 후 BBL GasPak Anaerobic System을 이용하여 혼기 조건을 형성한 후 37°C에서 약 3~5일간 배양하였다. 배양이 끝난 후 균수를 측정하여 항균력을 검사하였다. 표 1에 계란 항체의 농도별 배양균수를 나타내었다.

[표 1]

항체의농도	0 ppm	10 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm	
균수(셀/ml)	5×10^9 셀	3.5×10^5 셀	2.2×10^3 셀	7.2×10^2 셀	6×10^2 셀	

한편 파이토스핑고신의 피부 유해균에 대한 항균력을 측정하기 위해서는 프로피오니박테리움 아크네스와 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus* ATCC-12600) 사용하였다. 프로피오니박테리움 아크네스는 상기의 배지를 사용하였으며, 스타필로코커스 아우레우스의 배양에는 *Staphylococcus Medium 110* (Difco사)을 사용하였다. 배양조건은 프로피오니박테리움 아크네스는 상기의 조건과 동일한 조건으로 하였으며 스타필로코커스 아우레우스의 배양은 호기적 조건에서 37°C에서 약 1~2일간 배양하였다.

파이토스핑고신 및 그 유도체의 시료 제조는 세라마이드의 경우는 세라마이드를 1mg/ml의 농도로 아이소세틸알콜에서 녹인 것을 시료로 사용하였고 파이토스핑고신(Phytosphingosine), 테트라아세틸파이토스핑고신(Tetraacetylphytosphingosine), N-아세틸파이토스핑고신(N-acetylphytosphingosine)을 에탄올을 이용하여 1mg/ml의 농도로 녹여 사용하였다. 각각의 미생물을 배양하여 10배씩 순차적으로 희석하여 각각의 배양 배지에 도말하여 배양한 후 한 평판 배지 당 약 10^3 ~ 10^4 개의 접락을 형성하는 희석배수를 결정하였다. 각각의 미생물을 배양한 후 상기의 실험에서 결정된 희석배수로 희석하였다(이때 희석용액으로는 0.85% NaCl을 사용한다).

상기의 방법으로 준비한 시료를 시료준비에 사용한 동일한 용매에 순차적으로 희석하여 원하는 농도를 만든 후 희석한 시료 1ml을 9ml의 미생물 희석용액에 첨가하고 충분히 혼합하였다. 대조구의 경우는 시료용해에 사용한 용매를 사용한다. 37°C에서 30분~1시간 방치한 후(가끔 혼합해줌) 배지에 100ul씩 도말한 후 각각의 배양조건에서 배양하고 배양이 끝난 후 접락의 수를 측정하였다.

도 2a는 프로피오니박테리움 아크네스 균체에 대한 세라마이드, 파이토스핑고신 및 에리트로마이신 농도별 항균력을 측정한 그레프이다.

본 그레프에 나타난 바와 같이, 파이토스핑고신의 항균력으로 인해 배지내의 프로피오니박테리움 아크네스는 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 파이토스핑고신 농도에서는 성장하지 못하였으며, 에리트로마이신의 경우 약 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 농도에서 프로피오니박테리움 아크네스 균주가 성장하지 못하였다. 그러나 세라마이드만을 배양액 내에 투여한 경우 프로피오니박테리움 아크네스 균주의 생장 저해 효과는 발견되지 않았다.

도 2b는 스타필로코커스 아우레우스 균체에 대한 파이토스핑고신, 파이토스핑고신-젖산, 염산파이토스핑고신, 탄소수 11의 세라마이드 및 대조군의 농도별 항균력을 측정한 그레프이다.

본 그레프에 나타난 바와 같이, 파이토스핑고신, 파이토스핑고신-젖산 및 염산파이토스핑고신의 경우 스타필로코커스 아우레우스에 대한 균주 성장 저해 효과가 가장 현저하였으나, 세라마이드 11의 경우 약간의 저해 효과만 나타내었으며 아무런 처치도 하지 않은 대조군의 경우 스타필로코커스 아우레우스에 대한 배양 저해 효과는 관찰되지 않았다.

(설시예 4) 여드름 치료용 크림 조성물의 제조

본 발명의 피부 보호용 조성물은 지질상과 수상으로 나누어 제조한 뒤에 수상을 지질상에 서서히 첨가하여 제조한다.

먼저, 지질상은 트리카프로이드 5g에 스테아린산 1g, 콜레스테롤 2.5g를 가하여 온도를 80°C까지 승온시킨다. 혼합물이 완전히 용해되면 세라마이드((주)두산 바이오텍 제품 DS-Ceramide) 5g을 가하여 용해될 때까지 교반 시킨다. 다시 레시던 2g를 가하여 용해시킨 후에 올레인산 1g과 리놀레인산 0.5g를 가한다. 수상은 중류수 80g을 80°C까지 승온시킨다. 파이토스핑고신 및 그 유도체((주)두산바이오텍 제품)를 1.5g을 가하고 젖산을 약 0.45g 가하여 완전히 용해시킨 뒤, 80°C로 유지되는 수상에 지질상을 서서히 가하면서 60분간 4,000rpm으로 교반시킨 후 냉각하면서 60°C가 되는 점에서 0.2%가 되도록 계란항체를 첨가하여 크림상의 조성물을 수득하였다.

(실시예 5) 크림조성물의 피부미생물 억제 효과

상기 방법에 의해 제조된 본 발명 크림 조성물을 이용하여 피부 미생물의 억제효과를 시험하였다.

크림조성물의 미생물에 대한 억제시험은 다음과 같은 방법을 사용하였다. 실험 대상자 10명을 선발하여 얼굴의 한쪽 면에만 본 발명 크림 조성물을 도포하고 2시간이 경과한 후 안면 양쪽의 미생물 분포를 조사하였다. 멸균솜을 이용하여 안면의 양쪽을 닦아낸 후 멸균증류수에 넣어 약 3분간 강하게 교반한다. 교반이 끝난 용액을 100 μ l를 채취해 트립틱소이(Tryptic soy) 한천 배지에 도말한 후에 37°C에서 24시간 배양하고 형성된 접락의 수를 측정하여 억제효과를 도표로 나타낸 것이다.

[표 2]

피험자번호	대조군 크림	크림 W/세리스	감소비율
1	1345	129	0.09
2	684	254	0.37
3	345	176	0.51
4	725	151	0.2
5	2165	550	0.25
6	2233	211	0.09
7	1154	121	0.1
8	3425	362	0.1
9	591	385	0.65
10	3426	310	0.09

표 2에 나타난 바와 같이, 본 발명의 계란 향체와 스펙고리피드를 함유하는 크림의 경우 일반 크림에 비해 약 2~10배 정도의 피부미생물 억제 효과를 나타내었다.

(실시예 6) 크림조성물의 항염증 효과 파악

크림조성분의 항염증 효과를 파악하기 위해 피부 표피세포를 사용하여 프로테인키나제 C(PKC)의 억제효과를 보았다.

표피세포를 2×10^7 세포/ml이 되도록 배양한 후 파이토스펙고신 및 그 유도체의 함량이 100uM, 400uM이 되도록 첨가한 후 반응시켰다. 상기의 세포를 PBS로 세척한 후 호모게나이저로 세포를 파쇄하였다. 세포의 파쇄액을 원심 분리하고 상동액을 DE52 칼럼을 통과시키면서 프로테인키나제 C를 함유하는 부분을 얻었다. 활성화된 PKC 반응을 위해 PKC 코액티베이션(coactivation) 5X 완충액, PKC 활성(activation) 5X 완충액, PKC 비오티닐레이티드(biotinylated) 웨타이드 기질, (32P)ATP 혼합액을 각각 5ul를 첨가한 투브와 대조 반응을 보기 위해 PKC 코액티베이션 5X 완충액, 대조군 5X 완충액, PKC 비오티닐레이티드 웨타이드 기질, (32P)ATP 혼합액을 각각 5ul 함유한 투브를 준비하고 각각에 5ul의 효소를 첨가한 후 30°C에서 5분간 반응하였다.

반응 후 12.5ul의 반응정지 용액을 첨가하여 반응을 정지시킨 후 10ul를 SAM2TM 멤브레인에 떨어뜨린 후 2M NaCl로 30초간 1회, 2M NaCl로 2분간 3회, 1% H₃PO₄와 2M NaCl용액에 2분간 4회, 증류수로 30초간 2회 세척한 후 건조한 후 방사성 동위원소를 측정하여 PKC 저해효과를 측정하였다. 대조군으로는 화장품 제조시 자극완화제로 많이 사용되는 성분인 감초 추출물을 사용하였다.

도 3은 본 발명의 파이토스펙고신을 함유한 여드름 치료용 조성물의 PKC 저해효과를 대조군인 감초추출물과 비교하여 나타낸 그레프이다.

도 3에 나타난 바와 같이, 파이토스핑고신(PS), 테트라아세틸파이토스핑고신(TAPS), N-아세틸파이토스핑고신(N-APS)를 사용한 경우 PKC에 대한 억제효과가 낮은 농도에서도 우수하였으며 이는 화장품등에서 자극완화제로 많이 사용되고 있는 감초추출물에 비해서도 효과가 우수함을 알 수 있다.

(실시예 7) 크림조성물의 임상실험

상기 크림 조성물의 임상실험을 위해 30명의 여드름 환자를 대상으로 이화여대 부속병원 피부과에서 임상실험을 실시하였다.

크림의 도포는 하루에 2회 비누 세안 후 도포하였으며 일체의 다른 국소 도포제 및 외용 화장품을 도포하지 않도록 하였다. 임상적인 관찰은 Marks와 Ellis의 관찰방법을 참조하여 치료 전후에 일주 간격으로 폐쇄성 및 개방성 면포, 구진 및 농포의 수를 관찰하였다. 중심부위는 이마의 경우 8×4 cm크기의 골조를 만들어 중심이 코의 중심선과 일치 시켰고, 아래 경계부는 안구 상면에 일치시켰다. 양 뺨의 경우 4×5 cm 크기의 골조를 만들어 바깥 경계부는 외측 안구 돌출부에, 위 경계는 안구 하면에 일치시켜 병변의 수적 관찰부위를 항상 일정하게 유지하였다.

결과의 판정은 환자 및 의사에 의한 임상적 평가를 병변이 현저히 개선된 경우를 최우수, 중등도 이상 개선된 경우를 우수, 약간의 호전을 보인 경우를 양호, 전혀 변화가 없는 경우를 불량으로 4등급하여 판정하였다. 또한 Williamson과 Kligman의 'Scrub 방법'을 이용하여 세균학적 관찰을 동시에 진행하였다. 균체의 체취는 환자의 협부를 세안 후 75%의 이소프로필알콜로 문지른 후 건조시키고 직경 2 cm의 무균성 원통형 유리기구를 협부에 올려놓고 0.05% Triton X-100용액 1cc를 놓은 후 끝이 무디고 평면한 막대기로 1분간 고루 문지르고 무균성 주사기로 다시 용액을 채취하였다. 이 용액을 Brecella배지에 접종하여 37°C에서 7일간 배양한 후 균체를 동정하였다.

임상적 평가소견을 표 3에 나타내었다.

[표 3]

임상적 평가	환자수(%)
최우수	5(17)
우수	10(33)
양호	9(30)
무변	6(20)

상기의 표에서와 같이 약 17%에서 아주 우수한 결과를 얻었으며 병세가 호전된 경우는 약 80%에 이르렀다. 여드름의 임상병변인 폐쇄성 및 개방성 면포, 구진 및 농포의 수를 비교관찰한 결과에서도 병변의 수가 치료전 4~70까지 분포하였고 평균 및 표준편차가 25 ± 16.27 이었으며 치료후는 0~60까지 분포하여 평균 및 표준편차가 13 ± 10.5 로 치료후 병변이 감소함을 관찰하였으며 paired T-test결과 $p < 0.001$ 로서 통계학적 의의를 보였다. 환자의 평가도 염증이 현저히 감소하였나고 평가한 경우가 많았다. 대상환자중 24명에서 세균 배양을 실시하였는데, 4명에서만 프로피오니박테리움 아크네스가 자랐으며, 나머지 20명은 프로피오니박테리움 아크네스가 자라지 않았다.

발명의 효과

따라서 본 발명의 효과는 여드름균에 특이적인 계란황체와 피부 염증완화 및 손상된 피부 보호막의 회복에 효과가 우수한 스팅고지질 유도체를 복합적으로 사용함으로서 여드름의 예방 및 치료에 효과가 우수한 조성물을 개발한 것이며, 이는 현재 여드름 치료상 많은 문제를 야기하고 있는 스테로이드 호르몬제 및 항생제를 대체하여 비스테로이드성, 무 항생제 여드름 치료제의 개발을 통해 제약 및 기능성 화장품 산업에 널리 사용될 것으로 기대된다.

(57) 상구의 범위

청구항 1.

여드름균인 프로피오니박테리움 아크네스에 대한 계란황체 1.0 중량부에 대해 피부 보호막의 주요 성분인 스팽고리피드 0.1~10.0 중량부를 혼합한 여드름 예방 및 치료용 의약 조성물

청구항 2.

제 1항에 있어서, 상기 계란황체는 수용성 단백질 부분을 초미세여과하여 분자량 10만 이상인 감마-리베친임을 특징으로 하는 의약 조성물

청구항 3.

제 1항에 있어서, 상기 스팽고리피드는 세라마이드 3, 세라마이드 6, 파이토스팡고신, N-아세틸파이토스팡고신, 테트라아세틸파이토스팡고신, C 6-파이토세라마이드, 스팽가닌, 스팽고신 등에서 선택된 1종 이상의 것임을 특징으로 하는 의약 조성물

청구항 4.

제 1항의 조성물을 사용하여 프로피오니박테리움 아크네스, 스타필로코커스 아우레우스 등의 피부 유해 미생물의 증식 억제 및 상기 미생물의 작용에 의한 염증을 억제함으로서 여드름에 의해 야기되는 피부손상을 빠르게 회복시키는 방법

청구항 5.

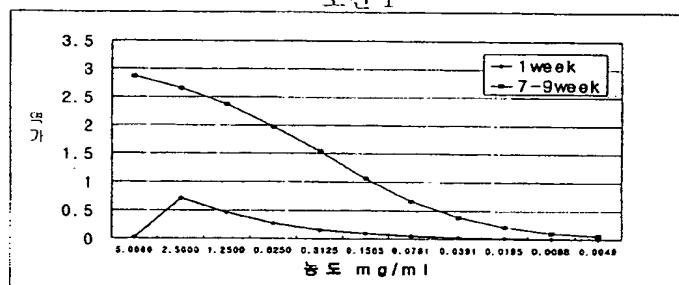
제 1항의 조성물을 유효성분으로 0.01~30중량%를 함유한 스킨, 로션, 크림, 비누, 바디클린저, 연고제

청구항 6.

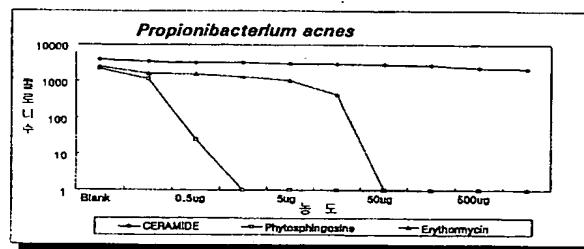
제 5항에 있어서, 계란황체의 함량이 0.05~1.0 중량%이고 스팽고리피드의 함량이 0.05~1.5 중량%임을 특징으로 하는 스킨, 로션, 크림, 비누, 바디클린저, 연고제

도면

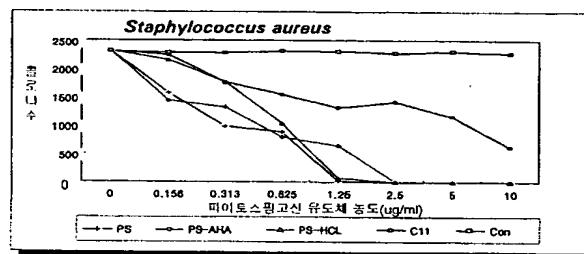
도면 1



도면 2a



도면 2b



도면 3

